

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Franc Agatić

**UTJECAJ INFEKCIJE PŠENICE S PLIJESNI *Fusarium culmorum* NA
ODABRANE POKAZATELJE KAKVOĆE PŠENIČNOG SLADA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za bioprocesno inženjerstvo

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Biotehnološka proizvodnja hrane
Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. lipnja 2014.
Mentor: doc. dr.sc. Natalija Velić
Pomoć pri izradi: Kristina Habschied, dipl. ing.

UTJECAJ INFEKCIJE PŠENICE S PLIJESNI *Fusarium culmorum* NA ODABRANE POKAZATELJE KAKVOĆE PŠENIČNOG SLADA

Franc Agatić, 174/DI

Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj infekcije pšenice s plijesni *Fusarium culmorum* na odabrane pokazatelje kakvoće pšeničnog slada. Provedeno je mikroslađenje dva genotipa pšenice Lucija i Osk. 110/09 od kojih je svaki genotip bio predstavljen s četiri uzorka; uzorak „1“ je kontrola, uzorak „2“ je tretiran fungicidima i nije umjetno inficiran s plijesni, uzorak „3“ je inficiran s plijesni *F. culmorum* i tretiran fungicidima te uzorak „4“ inficiran s plijesni *F. culmorum* i nije tretiran fungicidima. Nakon mikroslađenja, provedena je mikotoksikološka analiza dobivenih uzoraka slada (osušeni i stabilizirani), kao i uzoraka pšenice. Nadalje, ispitivan je utjecaj infekcije s plijesni *F. culmorum* i tretmana fungicidima na masu 1000 zrna, hektolitarsku masu zrna slada, razliku ekstrakta, boju sladovine, vrijeme oštećenja, brzinu filtracije, udio formolnog dušika (FAN), Kolbach index te udio alkohola u prevreloj sladovini. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da infekcija oba korištena genotipa pšenice s plijesni *F. culmorum* pridonosi smanjenju kakvoće dobivenog slada.

Ključne riječi: pšenica, pšenični slad, infekcija, *Fusarium culmorum*

Rad sadrži: 46 stranica
18 slika
2 tablice
0 priloga
77 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Vinko Krstanović | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Natalija Velić | član-mentor |
| 3. dr. sc. Valentina Španić | član |
| 4. prof. dr. sc. Tomislav Klapac | zamjena člana |

Datum obrane: 10. listopada, 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Process Engineering

Sub-department of Bioprocess Engineering

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Biotechnological food production

Thesis subject approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IX held on June 18, 2014.

Mentor: PhD, Natalija Velić, Assistant Prof.

Technical assistance: Kristina Habschied, MSc.

THE INFLUENCE OF *Fusarium culmorum* WHEAT INFECTION ON SELECTED INDICATORS OF WHEAT MALT QUALITY

Franč Agatić, 174/DI

Summary:

The aim of this study was to determine the effect of *Fusarium culmorum* fungi infection of wheat on the wheat malt quality indicators. Conducted micromalting procedure included two different wheat genotypes, Lucija and Osk. 110/09- each variety contained four samples, where the sample „1" was the control, the sample „2" was not contaminated with fungus and was treated with fungicides, sample „3" was contaminated with *F. culmorum* and treated with fungicides and sample „4" was contaminated with *F. culmorum* and was not treated with fungicides. Mycotoxicological analysis were conducted on wheat and malt samples (dried and stabilized malt). The impact of *F. culmorum* contamination on some malt quality parameters was examined. This included the test weight and of 1000 kernel weight of malt, extract difference, congress wort colour, saccharification time, filtration speed, formol nitrogen share (FAN), Kolbach index and alcohol share in congress wort. The results showed that contamination of wheat with *F. culmorum* significantly contributed wheat malt quality indicators decrease.

Key words: wheat, wheat malt, infection, *Fusarium culmorum*

Thesis contains: 46 pages
18 figures
2 tables
0 supplements
77 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Vinko Krstanović, PhD, associate prof. | Chair person |
| 2. Natalija Velić, PhD, assistant. prof. | Supervisor |
| 3. Valentina Španić, PhD, scientific advisor | Member |
| 4. Tomislav Klapac, PhD, full prof. | stand-in |

Defense date: 10. October.2014

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio.....	3
2.1 pšenica kao pivarska sirovina	4
2.2. PROIZVODNJA PŠENIČNOG SLADA	4
2.2.1. Apsorpcija vode u zrno	5
2.2.2. Klijanje	6
2.2.3. Stabilizacija zrna slada	6
2.3. POKAZATELJI KAKVOĆE PŠENIČNOG SLADA	7
2.4 PLIJESNI RODA <i>Fusarium</i>	9
2.4.1. Plijesan <i>Fusarium culmorum</i>	10
2.4.2. Utjecaj kontaminacije žitarica plijesnima roda <i>Fusarium</i> na kakvoću slada i piva.....	11
2.5. MIKOTOKSINI U ZRNU PŠENICE I PŠENIČNOG SLADA	13
2.5.1. Trihoteceni	13
2.6. KONTROLA MIKROFLORE NA ŽITARICAMA PRIJE I TIJEKOM SLAĐENJA.....	16
3. Eksperimentalni dio	18
3.1. Zadatak	19
3.2. Materijal i metode.....	19
3.2.1. Mikroslađenje.....	19
3.2.2. Analiza slada	20
3.2.3. Ukomljavanje.....	21
3.2.4. Analiza multimikotoksina na LC-MS/MS uređaju	22
3.2.5. Računske metode i program za obradu rezultata	24
4. Rezultati.....	25
4.1. PRAĆENJE POKAZATELJA KAKVOĆE SLADA	26
4.2. PRAĆENJE KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA TIJEKOM SLAĐENJA PŠENICE.....	30
5. RASPRAVA.....	32
5.1.PRAĆENJE POKAZATELJA KAKOVOĆE SLADA.....	33
5.2. PRAĆENJE KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA TIJEKOM SLAĐENJA PŠENICE.....	35
6. ZAKLJUČCI	37
7. LITERATURA	39

1. UVOD

Fuzarioza klasa (eng. *Fusarium Head Blight*) kod žitarica, posebno ječma i pšenice, uzrokovana plijesnima roda *Fusarium* očituje se značajnim ekonomskim gubitcima zbog smanjenja prinosa, te narušava tehnološku kakvoću i zdravstvenu ispravnost zrna. Zbog toga se šarže zrna žitarica, prihvatljive po svim drugim pokazateljima kakvoće, a inficirane ovom plijesni, smatraju nepogodnima za slađenje (Schwarz i sur., 1997). Da bi se osigurala zadovoljavajuća kvaliteta zrna, infekciju plijesnima najbolje je spriječiti već u polju primjenom različitih mjera (zaoravanje žetvenih ostataka, izmjena usjeva, primjena fungicida i genetska otpornost), te onemogućiti njihov razvoj dalje tijekom skladištenja i slađenja pšenice.

Plijesan *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (telemorf nepoznat) uzrokuje različite probleme tijekom slađenja i proizvodnje piva: smanjuje kakvoću sirovine (slabija nalivenost zrna, smanjenje udjela endosperma, narušen odnos škrob:proteini), uzrokuje tehnološke gubitke (smanjen udio ekstrakta, pojačano pjenjenje piva), te sintetizira mikotoksine (trihotecene, zearalenon) koji narušavaju zdravstvenu ispravnost slada.

Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj infekcije pšenice s plijesni *F. culmorum* na parametre kakvoće gotovog slada te na koncentraciju i vrstu mikotoksina u gotovom sladu. Provedeno je mikroslađenje uzoraka pšenice dobivene iz pokusa postavljenih u četiri tretmana te je provedena toksikološka analiza uzoraka neslađene pšenice, zelenog slada (zrno nakon slađenja, zračno suho) i slada, kao i određivanje parametara kakvoće slada.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PŠENICA KAO PIVARSKA SIROVINA

Pšenica (*Triticum aestivum*L.) je jedna od najraširenijih žitarica na svijetu, vrlo bogata škrobom, te je zbog toga prikladna za korištenje kao sirovina za proizvodnju piva. Smatra se da se pšenica kao pivarska sirovina, uz ječam, koristila od samih početaka proizvodnje piva (Marić i sur., 1995.). U pivarskoj industriji koristi se neslađena i slađena pšenica. Neslađena pšenica može se koristiti u obliku cjelovitog, usitnjenog zrna ili krupice, te brašna; zatim pšenice u kojoj je škrob preželatiziran, te pšeničnog sirupa. Neslađena pšenica koristi se kao dodatak ječmenom sladu s ciljem povećanja ukupnog ekstrakta u pivu, što nadalje rezultira jeftinijom proizvodnjom. Također se koristi kako bi se osigurala punoća okusa, kao i stabilnost piva i pjene. Postupkom slađenja, prilikom čega se u zrnju odvijaju brojni procesi i sinteze novih ili aktivacija starih enzima, dobiva se slađena pšenica koja se koristi za proizvodnju pšeničnog piva. Pšenica koja se koristi za proizvodnju piva mora biti mikrobiološki ispravna, potpuno zrela te imati zadovoljavajuću klijavost i energiju klijanja.

Zrno pšenice ovalnog je oblika s dubokim središnjim usjekom u unutrašnjost endosperma. Nakon žetve pšenica više ne posjeduje pljevicu te zrno pšenice kao takvo upija vodu brže od ječma, čime se skraćuje vrijeme namakanja prilikom slađenja. Na vrhu zrna nalazi se bradica prepuna cjevastih dlačica, koje imaju važnu ulogu u apsorpcijskim procesima tijekom močenja. Nedostatak pljevice predstavlja problem tijekom klijanja, jer je zametak nezaštićen i može doći do odvajanja zrna. Klica predstavlja najvrjedniji dio zrna, jer su u njoj koncentrirani enzimi, vitamini, esencijalne aminokiseline, ali i visok udio masti što klicu čini osjetljivom i kemijski nestabilnom, no lako odvojivom od slada prilikom otklicavanja (Chandra, 1997.).

Najveći udio zrna predstavlja endosperm, koji je i tehnološki najvažniji dio jer ima najveći utjecaj na mogućnost modifikacije zrna tijekom slađenja te kasnije tijekom ukomljavanja (Chandra, 1997.). Pšenični škrob ima nižu temperaturu želatinizacije od ječmenog, zbog čega se neslađena pšenica, kako je već navedeno, koristi kao dodatak pri proizvodnji piva.

2.2. PROIZVODNJA PŠENIČNOG SLADA

Slađenje se može definirati kao proces klijanja u umjetno stvorenim, kontroliranim uvjetima, pri čemu se postavljanjem procesnih uvjeta iniciraju i usmjeravaju fiziološki i biokemijski procesi u zrnju. Tijekom postupka slađenja dolazi do djelomične razgradnje zrna te

sinteze novih ili aktivacije već prisutnih enzima. Slad služi kao prirodni izvor mnogobrojnih enzima (amilolitičkih, proteolitičkih te citolitičkih).

Tehnološki proces proizvodnje slada obuhvaća:

1. čišćenje i sortiranje zrna;
2. močenje zrna;
3. klijanje namočenog zrna;
4. sušenje zelenog slada te
5. dorada osušenog slada.

Tijekom procesa slađenja zrno prolazi kroz tri osnovne faze:

1. apsorpcija vode (bubrenje),
2. rast klice i korjenčića (klijanje) i zaustavljanje rasta te
3. stabilizacija zrna slada (sušenje) (Marić, 1982.)

Pšenica treba imati mali sadržaj proteina (do 12 %), mora biti potpuno zrela te imati zadovoljavajuću klijavost i energiju klijanja.

2.2.1. Apsorpcija vode u zrno

Močenjem zrno bubri i povećava volumen za jednu trećinu. Močenjem se osim aktivacije enzima induciraju i životne aktivnosti klice, te zrno počinje intenzivnije disati. Zbog toga zrno treba opskrbljivati vodom i kisikom. Močenje se provodi do vlažnosti zrna 43 – 44 %. Ako se primjeni shema pneumatskog močenja (Gaćeša, 1979.; Marić, 1982.), nakon 4 – 5 sati močenja pod vodom i 19 – 20 sati suhog močenja vlažnost zrna dostiže

30 – 32 %. Tijekom daljnjih 2 – 3 sata močenja vlažnost se povećava na 37 – 39 %, što je dovoljno za brzo započinjanje klijanja. U tom trenutku pšenica se iz močionika mora odmah prebaciti u kljalište, jer zadržavanje u močioniku nakon početka klijanja može dovesti do otpadanja lisne klice prilikom transporta u kljalište. Daljnje povećanje vlažnosti zrna provodi se u kljalištima postupkom orošavanja (Gaćeša, 1979.).

2.2.2. Klijanje

Tijekom klijanja dolazi do rasta nove biljke, te je za klijanje zrna potrebna velika količina energije i građevnih tvari, koji se dobivaju mobilizacijom i trošenjem zaliha koji su pohranjeni u zrnu.

Signalne tvari (hormoni giberelini i giberelinska kiselina) koji pokreću ovaj proces potječu iz klice - ukoliko je ona oštećena, odnosno odumrla te ne dolazi do promjena u endospermu, a klijanje je onemogućeno (Krstanović, 2004).

Cilj klijanja je sintetizirati dovoljno citolitičkih (endo- β -glukanaze, egzo- β -glukanaze, solubinaze), proteolitičkih (endopeptidaze, egzopeptidaze) i posebno amilolitičkih enzima (α -amilaza, β -amilaza)(Marić, 1982.; Leskošek-Čukalović, 2002.). Amilolitički enzimi razgrađuju škrob tijekom procesa ukomljavaanja i on postaje dostupan kvascima kao supstrat u fazi vrenja. Nadalje, razgradnjom škroba i proteina endosperma postiže se rastresita struktura i smežuran izgled slada. Razvoj klice i korjenčića u kljalištu osigurava se propuhivanjem zraka određene temperature (obično 2 °C niže od temperature zrna koje klija) i relativne vlažnosti zraka 70 – 90 % (ovisno o polaznim pokazateljima kakvoće za određenigenotip). Nakon klijanja dobiva se tzv. zeleni slad koji je zbog velike vlažnosti i udjela enzima kemijski i mikrobiološki nestabilan te ga je potrebno sušiti (Narziß, 1999.).

2.2.3. Stabilizacija zrna slada

Stabilizacija zrna slada provodi se sušenjem. Sušenjem se smanjuje vlažnost zrna, ukupni broj mikroorganizama, prekida se klijanje i razgradnja endosperma te nastaju obojene i aromatične tvari slada. Vlažnost zrna se smanjuje s oko 40 % na manje od 5 %. U prvoj fazi proces sušenja provodi se vrlo oprezno (temperatura manja od 50 °C, najčešće oko 40 °C) do vlažnosti zrna oko 10 %, kako ne bi došlo do smanjenja enzimske aktivnosti zrna. Ova se faza često naziva „stabilizacijom enzimskog potencijala slada". Druga faza u kojoj se uklanja preostala slobodna voda i voda vezana za koloidne sastojke zrna, provodi se pri višim temperaturama (80-85 °C za svijetli slad) te uz smanjen protok toplog zraka. Nakon sušenja slijedi hlađenje, otklicavanje te prikladno skladištenje slada. Prije upotrebe slad je potrebno skladištiti najmanje četiri tjedna, kako bi došlo do revitalizacije enzima i ujednačavanja vlažnosti (Krstanović, 2004).

2.3. POKAZATELJI KAKVOĆE PŠENIČNOG SLADA

Pokazatelji kakvoće pšeničnog slada, od kojih će neki biti obrađeni u ovom diplomskom radu, dijele se na:

I. Vanjski pokazatelji:

1. miris
2. izgled i boja
3. ujednačenost zrna
4. strane primjese
5. reološka svojstva

II. Mehaničko – fiziološki pokazatelji

1. debljina zrna
2. specifična masa
3. masa 1000 zrna
4. proba tonjenja
5. izgled presjeka
6. tvrdoća endosperma
7. dužina lisne klice
8. klijavost

III. Kemijsko - tehnološki pokazatelji kakvoće podrazumijevaju:

1. *Udio vlage* – uobičajeno je da je sadržaj vlage kod pšeničnog slada oko 8 %. Vlaga utječe na način skladištenja, jer slad s povećanom vlažnošću gubi tvari arome i otežano se melje. Preko vlage se također određuje udio suhe tvari u sladu na koju se preračunavaju ostali pokazatelji kakvoće.
2. *Ekstrakt slada* je najvažnija analiza kod ocjenjivanja kakvoće slada. Ova vrijednost daje uvid u tijek procesa ukomljavanja, jer određuje brzinu enzimske reakcije (razgradnje) tijekom ukomljavanja. Postupak ukomljavanja vrši se pri standardnim uvjetima pri čemu se dobiva kongresna sladovina kojoj se određuje ekstrakt. Za pšenični slad ekstrakt bi trebao biti oko 85 % na suhu tvar (Leskošek-Čukalović, 2002).

Kongresnom metodom ukomljavanja može se doći i do podataka za:

- a. razliku ekstrakta grube i fine meljave – daje uvid u citolitičku razgrađenost zrna. Što je slad bolje razgrađen, granulometrijski sastav prekrupe ima manji utjecaj na ekstrakciju sastojaka endosperma, odnosno razlika ekstrakta je manja.
- b. vrijeme ošećerenja – ova vrijednost daje uvid u aktivnost amilolitičkih enzima; razgrađenost endosperma i dostupnost škroba djelovanju enzima.
- c. miris i bistrinu sladovine – ovi pokazatelji moraju biti svojstveni tipu slada. Miris bi trebao biti opisan kao normalan, bez prisutnosti ustajalog ili pljesnivog mirisa. Bistrina sladovine se uobičajeno označava kao bistra, opalescentna ili mutna. Što je slad slabije razgrađen, to je sladovina mutnija.
- d. brzinu filtracije – brzina cijedenja sladovine kroz filter papir smatra se normalnom, ako je završena za 1 h. Ukoliko traje duže od 1 h smatra se sporom. Ovaj pokazatelj ukazuje na moguće problema tijekom fermentacije.
- e. boju kongresne sladovine – za pšeničnu sladovinu kreće se oko 8 EBC jedinica. Ukazuje na tip slada. Određuje se usporedbom boje sladovine i odgovarajućeg odabranog standarda. Najčešće se određuje spektrofotometrijski.
- f. pH sladovine – određuje se 30 min nakon početka filtracije, a uobičajene vrijednosti kreću se 5,6 – 5,9. Niže vrijednosti određuju kvalitetniji slad koji daje veće vrijednosti ekstrakta.

3. *Dodatne analize kongresne sladovine uključuju:*

- a. boju sladovine nakon kuhanja – daje uvid kakva će biti boja gotovog piva. Vrijednosti bi trebale iznositi oko 5,1 EBC jedinica.
- b. viskoznost – daje podatke o filtrabilnosti industrijske sladovine, odnosno piva. Standardne vrijednosti kreću se 1,51 – 1,63 m Pas⁻¹. Manja viskoznost podrazumijeva veću koloidnu stabilnost piva i bolju filtrabilnost. Viskoznost ovisi o razgrađenosti škroba, te aktivnosti amilolitičkih enzima.
- c. fermentabilnost slada (granična prevrelost) – odnosi se na udio fermentabilnog ekstrakta koji kvasac može fermentirati.

4. *Frakcije s dušikom:*

- a. ukupni dušik – određuje se metodom po Kjeldal-u. Slad s nižim vrijednostima udjela dušika daje veće vrijednosti ekstrakta. Poželjno je da je vrijednost ukupnog dušikamanja od 10,8 %.

- b. topljivi dušik – spojevi s dušikom koji prelaze u kongresnu sladovinu tijekom ukomljavanja. Vrijednosti se preračunavaju na slad i izražavaju u postotcima na suhu tvar. Kreću se u rasponu 0,55 – 0,75 % s.tv.
 - c. Udio ukupnih proteina i udio topljivih proteina – dobiju se množenjem udjela ukupnog i topljivog dušika s faktorom 6,25.
 - d. Kolbach index – stupanj razgrađenosti proteina. Označava postotak ukupnog dušika slada koji je prešao u sladovinu tijekom ukomljavanja. To je pokazatelj proteolitičke razgrađenosti slada.
 - e. formolni dušik (FAN) – sadržaj niskomolekularnih dušičnih spojeva pri titraciji s formaldehidom. Uobičajeno je da se vrijednosti kreću 180 – 220 g/s. tv. slada.
5. *Enzimski potencijal slada:*
- a. Dijastatska snaga slada
6. *Hartong-ov broj* – daje uvid u razgrađenost slada, enzimsku aktivnost i proteolitičku razgrađenost. Vršiti se ukomljavanje na 4 temperature: 20 °C, 45 °C, 65 °C i 80 °C, za koje se određuje sadržaj ekstrakta.
7. *Ostali pokazatelji kakvoćeslada iskazuju se preko udjela:*
- a. β – glukana
 - b. fenolnih spojeva
 - c. dimetil sulfida (DMS) i prekursora
 - d. N-nitrozo spojeva
 - e. ostataka pesticida
 - f. iona teških metala.

2.4. PLIJESNI RODA *Fusarium*

Plijesni roda *Fusarium* su najčešće prisutne plijesni na žitaricama u našem podneblju (Jurković i sur., 1998.), pri čemu kontaminacija pšenice kao sladarske sirovine može rezultirati kontaminacijom piva mikotoksinima koje te plijesni sintetiziraju. Plijesni roda *Fusarium* uključuju navedene vrste: *F. acuminatum*, *F. anthophilum*, *F. avanceum*, *F. cerealis*, *F. chlamydosporum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutaminans*, *F. tricintum*, *F. verticilioides*, i dr. (Logrieco i sur., 2003.). Ove plijesni mogu

preživjeti i duže od godinu dana u površinskom sloju tla i pri tome ostati aktivne (Teich, 1989.). Prelaze iz tla u biljku u kojoj su latentno prisutne gdje luče svoje toksine od kojih je za sladarsku i pivarsku industriju najvažniji deoksinivalenol koji direktno utječe na narušavanje kakvoće slada.

U Hrvatskoj je zastupljeno više vrsta plijesni roda *Fusarium*, pri čemu je prevladavajuća vrsta na području Istočne Hrvatske *F. graminearum* (Jurković i sur., 1998., Krstanović i sur., 2005.). Šarža zrna koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a kontaminirana je ovim plijesnima, smatra se nepogodnom za slađenje (Schwarz i sur., 1997.). Fuzarioza, bolest koju izazivaju plijesni roda *Fusarium*, u kvantitativnom i kvalitativnom pogledu za pšenicu može imati velik značaj. Prilikom jake kontaminacije prinosi mogu biti značajno smanjeni (preko 30%) uz pogoršanje kakvoće zrna.

2.4.1. Plijesan *Fusarium culmorum*

F. culmorum (Slika 1) pripada sekciji *Discolor*. Ove plijesni ne formiraju mikrokonidije, osim pri određenim uvjetima uzgoja i generalno ih se identificira prema morfologiji makrokonidija (Wagacha i Muthomi, 2007.). *F. culmorum* proizvodi kratke, zdepaste makrokonidije debelih stijenki (Slika 1). S prednje i stražnje strane površina makrokonidija je zaobljena (Nelson et al., 1983.). Klamidiospore se stvaraju brzo i mnogobrojne su, mogu se pojavljivati kao jedinke, ali i u obliku lanaca ili grudica (eng. *clumps*). Na krumpirovom agaru rast bijelog (često zna biti i žuti do oker boje) zračnog micelija je izrazito brz. Narančasti ili crveno-smeđi pigmenti javljaju se kako micelij stari, a agarna podloga poprima žarko crvenu boju (eng. *carmine red*). *F. culmorum* prevladava u hladnijim, sjevernijim dijelovima Europe (sjeverna, centralna i zapadna Europa) te u Kanadi (Parry et al., 1995; Demeke et al., 2005). Trenutni trend globalnog zagrijavanja uzrokuje povlačenje ove plijesni pred plijesni *F. graminearum* kojoj pogoduju topliji klimatski uvjeti (Wagacha i Muthomi, 2007.).

F. culmorum producira seksualne spore (konidije) koje se vjetrom ili kišom šire na žitarice u cvatnji. Uspješnost kontaminacije ovisi o više čimbenika, a najviše o klimatskim uvjetima - temperaturi i vlazi zraka (Lacey et al. 1999; Brennan et al., 2005.).



Slika 1 Zrna pšenice kontaminirane s plijesni *F. culmorum*na selektivnoj podlozi prema MEBAK-u i makrokonidije

2.4.2. Utjecaj kontaminacije žitarica plijesnima roda *Fusarium* na kakvoću slada i piva

Mikrobna proliferacija na zrnu ječma, odnosno pšenice je uobičajena pojava tijekom procesa slađenja, koja na kakvoću slada može imati pozitivne i negativne učinke. Pozitivni učinci mikroflore zrna podrazumijevaju proizvodnju mikrobnih metabolita kao što su biljni hormoni koji stimuliraju klijanje pšenice (Tuomi i sur., 1995; Flannigan, 1996; Noots i sur., 1999) te pridonose enzimskom potencijalu slada stimulirajući proizvodnju amilolitičkih, proteolitičkih i celulolitičkih enzima (Boyacioğlu & Hettiarachchy, 1995; Flannigan, 1996; Noots i sur., 1999; Van Campenhout, 2000). Istraživanje koje su proveli Schwarz i sur. (2002.) pokazalo je da je u zrnima ječma koja su kontaminirana plijesnima roda *Fusarium* došlo do razgradnje škroba u endospermu te da je proteinski matriks, koji inače okružuje granule škroba, razgrađen. Navedeno potvrđuje da ove plijesni sintetiziraju amilolitičke i proteolitičke enzime. Negativni učinci mikrobne proliferacije na zrnu sirovine za slađenje, odnosno sladu, uključuju i loš vizualni izgled zrna, kao i mogućnost pojave nepoželjnih aroma piva dobivenog od takvog slada. Plijesni roda *Fusarium* proizvode širok spektar sekundarnih metabolita, među kojima su i mikotoksini koji, prema nekim istraživanjima, uz hidrofobine djeluju na pojavu divljeg piva (piva koje se prekomjerno pjenu) (Lowe i Arendt, 2004; Christian i sur., 2010; Christian i sur., 2011;). Mikroflora zrna može također potrošnjom raspoloživog kisika uzrokovati smanjenje energije klijanja, na način da inducira dormantnost zrna (Papadopoulou i sur., 2000).

Simptomi kontaminacije plijesnima roda *Fusarium* posebno dolaze do izražaja tijekom procesa slađenja. Micelij plijesni *F. culmorum* razvija se kratko nakon močenja, a prepoznaje

se kao bijeli, zračni micelij čije hife prodiru u unutrašnjost zrna dajući mu dlakav izgled **Slika 2**. Mjesto najintenzivnijeg rasta plijesni je klica. Ona odumire, pa zrna jako kontaminirana (posebno kada je zahvaćena klica) plijesnima roda *Fusarium* u pravilu ne kliju. Ipak se unutar takvih zrna odvijaju promjene koje su slične onima tijekom klijanja i mogu se povezati s djelovanjem enzimskih sustava plijesni. Kod prevrtanja tijekom procesa slađenja bijeli micelij se razara i dobiva izgled mokre vate, a na njegovom mjestu zrno dobiva intenzivno ljubičastu boju koja se trajno zadržava na zrnu (**Slika 6**). Takva zrna nazivaju se relevantna crvena zrna (Niessen i sur., 1991).



Slika 2 *F. culmorum* na zelenom sladu pšenice (zračni micelij tijekom slađenja)

Fuzarioza utječe direktno i indirektno na kakvoću pšeničnog slada. Indirektno utječe na transport hranjivih sastojaka tijekom razvoja zrna i povezana je s razvojem micelija navedenih plijesni, a za posljedicu ima slabiju naličenost (masa 1000 zrna) tj. smanjenje udjela endosperma. S tim je povezan povećan udjel proteina, te smanjenje ekstrakta. Promjene kakvoće pšeničnog slada uzrokovane su visokom proteolitičkom aktivnosti koja dovodi do povišenja koncentracije topljivog dušika i slobodnog α -amino dušika (FAN, *eng.* free amino nitrogen) u sladovini, jakoj razgradnji stanične stjenke i smanjenoj amilolitičkoj aktivnosti zbog ometanja *de novo* sinteze α -amilaze pod utjecajem inhibitora iz plijesni (Greenhalgh i sur., 1986; Narziss, 1999; Schwarz i sur. 2001). Narušavanje zdravstvene ispravnosti sladarskih sirovina vezano je uz proizvodnju mikotoksina o kojima će biti riječi u nastavku.

2.5. MIKOTOKSINI U ZRNU PŠENICE I PŠENIČNOG SLADA

Mikotoksini su skupina sekundarnih metabolita plijesni koji nastaju kada se plijesan, nađe u uvjetima stresa (npr. suša), a predstavljaju značajnu opasnost u prehrambenom lancu, za ljude i životinje (Kłosovski i sur., 2010; Mankevičiene, 2011). Kontaminacija slada ovim metabolitima rezultat je proliferacije plijesni prisutnih na sirovinama za proizvodnju slada, a može imati negativan utjecaj na iskorištenje procesa proizvodnje piva. Odabirom odgovarajućih skladišnih uvjeta moguće je smanjiti proizvodnju mikotoksina. Plijesni s polja predstavljaju prijetnju zdravstvenoj sigurnosti žitarica i proizvoda od žitarica, pri čemu se vrste roda *Fusarium* smatraju najvažnijim proizvođačima mikotoksina iz te skupine (Habschied i sur., 2011b).

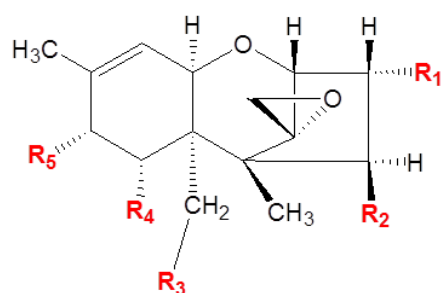
Mikotoksini koje proizvode plijesni roda *Fusarium* u najvećoj mjeri pripadaju skupini trihotecena. Osim trihotecena, plijesni roda *Fusarium* produciraju i mikotoksine koji imaju estrogeno djelovanje, od kojih je najpoznatiji zearalenon (ZEA) i njegovi derivati. Mnogi autori povezuju količinu mikotoksina sa stupnjem infekcije žitarica plijesnima roda *Fusarium* (Hart i sur., 1984; Lamper i sur., 2000; Schwarz i sur., 2001; Lori i sur., 2003). Trihoteceni su dobro topljivi u vodi, pa ovi spojevi prelaze s inficiranog zrna preko vode za močenje na zdrava zrna i zatim zaustavljaju ili usporavaju sintezu enzima tijekom slađenja, odnosno klijanja zrna.

2.5.1. Trihoteceni

Najveća skupina danas poznatih mikotoksina su trihoteceni, a smatra se da postoji oko 150 metabolita gljiva koji se svrstavaju u ovu grupu kemijskih spojeva. Trihotecene proizvode različite vrste plijesni roda *Fusarium*, ali i neke druge plijesni (*Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* i *Stachybotrys*) (Scott, 1989; Ueno, 1983).

Trihoteceni su velika skupina mikotoksina te se na osnovi svoje kemijske strukture mogu podijeliti u četiri skupine: A, B, C i D (Oancea i Stoia, 2008). Skupine A, B i C su ne-makrociklički trihoteceni (obzirom na položaj kisika u šesteročlanom prstenu), a pod skupinom D se podrazumijevaju makrociklički trihoteceni (Sudakin, 2003).

Svi trihoteceni izvode se iz osnovnog spoja trihotekana. Imaju strukturu tetracikličkog terpenoida, koja uključuje šesteročlani prsten s kisikom, epoksid u položaju 12, 13 i dvostruku vezu u položaju 9, 10, eventualno supstituiranu drugim epoksidom što se može vidjeti na **Slici 3** (da Rocha i sur., 2014). Osim toga, trihoteceni imaju supstituente koji sadrže kisik u jednom ili više ovih položaja: 3, 4, 7, 8 i 15. Supstituenti mogu biti esterificirani na hidroksilnoj, keto ili epoksidnoj skupini ili njihovoj kombinaciji. Većina prirodnih trihotecena sadrži epoksidni prsten i dvostruku vezu na C-12, 13, odnosno C-9, 10, i nazivaju se 12, 13-epoksitrihoteceni-9-nima (Desjardins i Proctor, 2007).



Trichotecen		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	HT-2	-OH	-OH	-OAc	-H	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	T-2	-OH	-OAc	-OAc	-H	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	DAS	-OH	-OAc	-OAc	-H	-H
B	DON	-OH	-H	-OH	-OH	=O
	3-AcDON	-OAc	-H	-OH	-OH	=O
	NIV	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
	FUSX	-OH	-OAc	-OH	-OH	=O

Slika 3 Struktura trihotecena (da Rocha i sur., 2014)

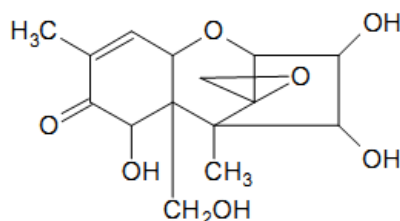
Garda-Buffon i sur. (2010) istraživali su utjecaj DON-a i T-2 toksina na aktivnost amilaze iz slada i pokazalo se da trihoteceni ometaju aktivnost amilaze tijekom slađenja, ali njihovo djelovanje ne pokazuje linearno ponašanje tijekom inhibicije enzima. Većina ovih toksina je termostabilna (Scott, 1984; Lauren i Ringrose, 1989; Wolf-Hall i sur, 1999.; Hazel i Patel, 2004; Pronik i sur., 2005), kuhanje sladovine tijekom proizvodnje piva na njih nema utjecaja, a dobra vodotopljivost trihotecena u vodi omogućava im prelazak iz sirovina u sladovinu i pivo (Trucksess i sur., 2001).

Trihoteceni pokazuju citotoksična i imunosupresivna svojstva, što je povezano s 12,13-epoksi grupom koja ima sposobnost inhibicije sinteze proteina vezivanjem na ribosome (Trucksess i sur., 2001; Legzdina i Buerstmayr, 2004). Svi navedeni mikotoksini ne predstavljaju samo rizik za zdravlje ljudi, već djeluju i kao snažni fitotoksini i tako utječu na sam proces slađenja.

Trihoteceni djeluju na inhibiciju sinteze eukariotskih proteina, jer ometaju inicijaciju, elongaciju i terminaciju sinteze proteina (Bennet i Klich, 2003; da Rocha i sur., 2014). Također, uzrokuju povraćanje, alimentarna krvarenja, kontaktni dermatitis (Beasley, 1989; Bentley i Bennet, 1999).

Nivalenol (NIV)

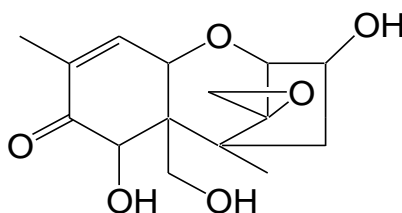
NIV **Slika 4** ima relativnu molekulsku masu 313,2 g/mol i molekulsku formulu $C_{15}H_{20}O_7$. Topljiv je u diklormetanu i metanolu, a djelomično je topljiv u vodi (Weidenbomer, 2001). Kao i ostali trihoteceni, NIV također štetno djeluje jer je hematotoksičan, imunotoksičan, embrio- i fetotoksičan, a uzrokuje i smanjenje tjelesne mase te smanjenje unosa hrane kod ljudi i životinja (Rai i Varma, 2010).



Slika 4 Strukturna formula nivalenola (Habschied i sur., 2013b)

Deoksinivalenol (DON)

DON **Slika 5** pripada skupini nemakrocikličkih trihotecena, a poznat je i pod nazivom vomitoksin jer uzrokuje povraćanje, odbijanje hrane (anoreksiju) i gubitak tjelesne mase kod ljudi i životinja (Sobrova i sur., 2010). Njegov kemijski naziv je 12,13-epoksi-3 α ,7 α ,15-trihidroksi trihotec-9-en-8-on. Molekularna formula je $C_{15}H_{20}O_6$, a relativna molekularna masa 296,3. Kristalizira u obliku bezbojnih iglica. Točka taljenja je na 151 – 153°C. Topljiv je u vodi i polarnim otapalima kao što su vodena otopina metanola, vodeni acetonitril i etilacetat. 12,13-epoksi skupina izrazito je stabilna na nukleofilne napade. DON je stabilan na 120°C te se ne razgrađuje pod blago kiselim uvjetima (Sudakin, 2003).

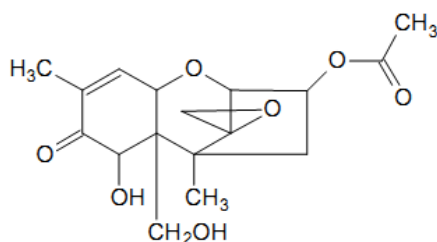


Slika 5 Kemijska struktura DON-a (Habschied i sur., 2013b)

Granice tolerancije za DON u gotovim proizvodima od žitarica namjenjenom za ljudsku prehranu iznose 1 µg/g, odnosno za stočnu hranu ovisno o vrsti životinja od 5 - 10 µg/g (Trucksess i Pohland., 2001). Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (MZSS, 2008) najveća dopuštena količina DON-a kod neprerađenih žitarica je 1250 µg/kg.

3-acetil-deoksinivalenol (3-ADON)

3-ADON **Slika 6** je maskirani mikotoksin i u žitaricama se najčešće pojavljuje uz DON (Berthiller i sur., 2012). Sinonimi za 3-ADON (**Slika 13**) su 3α-acetilvomitoksin, 3-acetil DON, 3-acetildeoksinivalenol, dehidronivalenol monoacetat, deoksinivalenol monoacetat. Relativna molekulska masa je 338,4 g/mol, a molekulska formula C₁₇H₂₂O₇. 3-ADON je topljiv u organskim otapalima kao što su acetonitril, metanol i etil acetat, a samo djelomično u vodi (Weidenbomer, 2001).



Slika 6 Strukturna formula 3-acetil-deoksinivalenola (Elbert i sur., 2010)

2.6. KONTROLA MIKROFLORE NA ŽITARICAMA PRIJE I TIJEKOM SLAĐENJA

Najbolji način kontrole je prevenirati kontaminaciju pšenice rodovima *Aspergillus* i *Fusarium* ili za slađenje koristiti isključivo zdravo zrno žitarica (Habschied i sur., 2011b).

Važnu ulogu u prevenciji infekcije na polju ima postupak obrade tla, npr. zaoravanje slame s povećanim udjelom celuloze i proteina pogoduje razvoju plijesni roda *Fusarium*. Ukoliko se primjeni duboko oranje, opasnost od pojave epidemije se smanjuje. Također je važno što se koristi kao predusjev, pa su tako zeljaste biljke (kupus, repa, krumpir) bolji predusjev pšenici nego biljke koje obogaćuju tlo dušikom (Narziss, 1999; Váňová i sur., 2008). Ukoliko su kao predusjev bili usjevi koji su podložniji napadu plijesni roda *Fusarium* (npr. kukuruz) veća je vjerojatnost infekcije pšenice koja kao usjev dolazi nakon njih. Najbolja zaštita pšenice od

fuzarioza je stvaranje otpornih genotipova na ovu bolest (Buerstmayr i sur., 1999; Bai i Shaner, 2004).

Mikrobna kontrola moguća je i tijekom skladištenja, obzirom da je u ovoj fazi moguće kontrolirati okolišne uvjete kao što su temperatura i vlažnost. Sposobnost *Fusarium* vrsta da proizvode mikotoksine smanjuje se s produljenjem vremena skladištenja, stoga se kao postupak za smanjenje broja plijesni roda *Fusarium* predlaže čuvanje inficiranih žitarica kroz duži vremenski period (Habschied i sur., 2011b).

Sprječavanje razvoja mikroflore i produkcije mikotoksina tijekom slađenja može se postići odabirom procesnih parametara ili primjenom različitih kemijskih i fizikalnih tretmana. Problem kod njih je što su neprihvatljivi krajnjim korisnicima i što ne dolazi do sprečavanja nastajanja mikotoksina ili njihove razgradnje kada već nastanu. Nepovoljna mikroflora može se smanjiti početnim močenjem zrna bez aeracije (Briggs i McGuinness, 1993). Močenje u razrijeđenim anorganskim kiselinama kao što su sumporna, fosforna i hipoklorasta kiselina (Doran i Briggs, 1993) te dodatak natrijevog hipoklorita u vodu za močenje uzrokuje smanjenje infekcije plijesnima, ali u visokim koncentracijama (> 0,1 %) nepovoljno utječe na klijanje zrna (Kieninger i sur., 1983).

Postoji malo mogućnosti kontroliranja mikroflore i produkcije mikotoksina preko procesa slađenja jer bi svaka promjena procesa koja bi bila dovoljno značajna da djeluje na mikrobni rast, ujedno imala i velik utjecaj na kakvoću slada. Naime, sama supresija rasta plijesni nije dovoljna budući da mikotoksini mogu biti prisutni i ako micelij plijesni nije vidljiv. Iako se veća količina mikotoksina ispere tijekom močenja, plijesan zadržava sposobnost produkcije mikotoksina tijekom i nakon močenja, klijanja i sušenja (Wolf-Hall, 2007).

Mikroorganizmi se mogu koristiti kao starter kulture u bioprocima (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, „sladarski kvasac“ *Geotrichum candidum*, vrste roda *Rhizopus*) u kojima je nepoželjna upotreba kemikalija, a imaju antimikrobni učinak, kao što je to slučaj sa slađenjem. Osim antimikrobnog učinka, korištenje starter kultura tijekom slađenja dovodi do poboljšanja fizikalnih i kemijskih parametara kakvoće gotovog slada (Linko i sur., 1998).

Codex Alimentarius Commission (2003) predlaže mjere kojima se može smanjiti prisustvo trihotecena, ZEA, OTA te fumonizina u žitaricama. Navedene mjere se odnose na sam način sjetve, na predžetvene i žetvene mjere, na uvjete skladištenja i transporta, te neke odrednice za unaprijeđenje budućeg monitoringa za mikotoksine.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj infekcije pšenice s plijesni *Fusarium culmorum* na kakvoću i mikotoksikološku ispravnost pšeničnog slada.

3.2. MATERIJALI I METODE

Uzorci pšenice dobiveni su s Poljoprivrednog Instituta Osijek. Inokulacija sporama plijesni *F. culmorum* je izvršena na polju, rasprskavanjem makrokonidija u fazicvatnje. Provedeno je ispitivanje dva genotipa pšenica žetve 2011. godine Lucija i Osk. 110/09 od kojih je svakigenotip bilo predstavljen sa po četiri uzorka: uzorak „1“ bio je kontrola, uzorak „2“ je bio tretiran fungicidima, uzorak „3“ je bio umjetno inficiran s plijesni *F. culmorum* i tretiran fungicidima i uzorak „4“ umjetno inficiran s plijesni *F. culmorum* i nije tretiran fungicidima. Ovi genotipovi su odabrani jer je genotip Osk. 110/09 podložniji infekciji plijesnima roda *Fusarium*, a genotip Lucija otporniji na infekciju istim plijesnima.

3.2.1. Mikroslađenje

Standardan postupak mikroslađenja za pivarski ječam kao sirovinu (MEBAK, 1997) modificiran je za potrebe mikroslađenja pšenice na način da su provedene korekcije vlažnosti. Kao posljedica odsutnosti pljevice zrno pšenice može vrlo brzo primiti vodu, pa se vrijeme namakanja mora skratiti, a stupanj relativne vlažnosti zraka pri klijanju smanjiti (Schuster i sur., 1990).

Za mikroslađenje pšenice korišteni su sljedeći uređaji:

- ✓ termo-inkubator s kontrolom vlage i temperature (Climacell 222, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München, Njemačka);
- ✓ sušionik (UFE 500, Memmert, Njemačka).

Močenje (2, uvjetno 3 dana) i klijanje zrna (4 dana) provedeni su u termo-inkubatoru s kontrolom vlage i temperature (Climacell 222, MMM Medcenter Einrichtungen). Za močenje je korištena vodovodna voda. Uzorci zelenog slada izuzeti su nakon postupka slađenja, odnosno prije nego je slad stavljen na sušenje te su zamrznuti do analize. Sušenje je provedeno prema protokolu kojeg propisuje MEBAK (1997) u sušioniku s ventilacijom. Uzorci su slađeni u

količini od 1 kg u paralelama. Otklicavanje (uklanjanje korjenčića i sladne klice) je izvršeno ručno, a period od sušenja do analize iznosio je mjesec dana kako bi se slad stabilizirao.

Za ovo istraživanje proveden je modificirani postupak mikroslađenja prema shemi prikazanoj u **Tablici 1**.

Tablica 1 Prilagođena shema mikroslađenja za pšenicu

Močenje			
Procesni parametri			
t / h	T / °C	Vlažnost zrna / %	Napomena
24	14	29	(1)
24	14	36	
24	14	44,5	(2); (3)
(1) u močioniku; (2) u kljalištu; (3) močenje orošavanjem			
Klijanje			
Procesni parametri			
t / h	T / °C	Rh _{zraka} / %	Napomena
72	14	90	(3); (4); (5)
(3) močenje orošavanjem; (4) podešavanje vlažnosti zrna do udjela vode od 44,5% prskanjem; (5) prevrtanje gomile dva puta dnevno			
Sušenje			
Procesni parametri			
t / h	T / °C		Napomena
16	50		(6)
1	60 (H ₂ O < 10%)		
1	70		
1	80		
(6) vrijeme sušenja 19 h, prema standardnom postupku sušenja za svijetli slad prema MEBAK-u			

3.2.2. Analiza slada

Nakon slađenja pšenice provedene su analize pokazatelja kakvoće slada za dobivene pšenične sladove prema standardnim metodama. Analize su provedene u Laboratoriju za kontrolu kakvoće Pivovare Osijek d.d. te u Laboratoriju za kvalitetu slada tvrtke Stamag u Beču.

Određivanje mase 1000 zrna

Masa 1000 zrna, važan pokazatelj kakvoće žitarica za slađenje provedena je prema metodi MEBAK 4.1.3.2. Ona je u korelaciji s ekstraktom žitarice koja se koristi za slađenje, te se s povećanjem mase 100 zrna povećava i sadržaj ekstrakta u pšenici. Obzirom da se masa 1000 zrna sa porastom vlage povećava, za objektivnu ocjenu potrebno je izraziti je na suhu masu zrna, prema sljedećem izrazu:

$$masa\ 1000\ zrna = \frac{masa\ 1000\ zrna\ [g] \times (100 - W)}{100} \quad W\text{-vlaga slada}$$

Hektolitarska masa

Hektolitarska masa (MEBAK, 4.1.3.3.) pokazuje kolika je masa 100 L pšenice.

3.2.3. Ukomljavanje

Osušeni pšenični slad samljeven je na laboratorijskom mlinu s diskovima prema metodi MEBAK 4.1.4.2.1. 50 g pšenične prekrupe ukomljeno je u čaši za ukomljavanje s 200 ml H₂O temperature 45 – 46 °C. Čaša je držana na vodenoj kupelji 30 min uz stalno miješanje (80 – 100 o/min). Tijekom sljedećih 25 min temperatura komine povišena je na 70 °C i to otprilike 1 °C po minuti. Kada je postignuta navedena temperatura dodano je 100 ml H₂O, također temperature 70°C, i održavana je 1 h **Tablica 2**. Nakon toga komina je ohlađena na sobnu temperaturu, te je profiltrirana preko nabranog filter papira.

Tablica 2 Parametri tijekom ukomljavanja pšeničnog slada

V _{H2O} / ml	T / °C	t / min
200	45-46	30
-	70	25
100	70	60

Vrijeme ošćerenja

Prilikom određivanja udjela ekstrakta određeno je i vrijeme oštećenja prema metodi MEBAK 4.1.4.2.4.

Brzina filtracije

Brzina filtracije određena je prema metodi MEBAK 4.1.4.2.5.

Vrenje kongresne sladovine

Vrenje sladovine provedeno je prema metodi određivanja graničnog stupnja prevrelosti sladovine i piva MEBAK **2.11.2.**

Udio alkohola

Udio alkohola u uzorcima prevrele sladovine određen je pomoću uređaja Beer Analyzer (Anton Paar, Austrija).

Kolbach indeks (MEBAK 4.1.4.5.3.)

$$Kolbach\ index\ (\%) = \frac{topljivi\ N\ [g / 100g\ s.tv]}{ukupni\ N\ [g / 100g\ s.tv]} \times 100$$

Slobodni α -amino dušik (FAN)

α -amino dušik je određivan EBC-ovom ninhidrinskom metodom koja daje vrijednosti koje odgovaraju slobodnom α -amino N iz aminokiselina (EBC, **3.1.4.5.5.1.**).

Boja kongresne sladovine i boja nakon kuhanja

Boja sladovine određena je sukladno s metodom EBC 3.1.4.2.8.2., a boja nakon kuhanja prema metodi EBC 3.1.4.2.9.

3.2.4. Analiza multimikotoksina na LC-MS/MS uređaju

Kemikalije

Prilikom analize korišten je standard trihotecena skupina A i B + ZEA u acetonitrilu Mix 4 (Biopure, Romer Labs). Ultra čista voda za pripremu otopina i mobilne faze je pročišćena reverznom osmozom i Millipore Simplicity Ultrapure WaterSystem (EMD Milipore Darmstadt, Njemačka) uređajem. Organska otapala (acetonitril, metanol) rabljena za ekstrakciju, pripremu kalibracijskih otopina i/ili mobilnih faza su bila HPLC čistoće (J. T. Baker, Ceveted, Nizozemska). Korišteni su također mravlja kiselina i amonijak HPLC čistoće.

Priprema uzoraka

Uzorci pšenice, zelenog slada i slada genotipova Lucija i OSK. 110/09 s Poljoprivrednog instituta Osijek pripremljene su prema metodi koju su u svom radu koristili Ren i sur. (2007). Prema protokolu, 10 g uzorka samljeveno je korištenjem laboratorijskog mlina tijekom 1 minute (M20, Ika, Staufen, Njemačka). Zatim je dodano 40 mL mješavine acetonitrila i vode (84:16, v/v) te je izvršena ekstrakcija miksanjem u laboratorijskom mikseru (LB10S, Waring, USA) tijekom 3 min **Slika 21**. Dobivenoj smjesi je prije filtracije dodano 40 mL acetonitrila te je sve filtrirano preko filter papira (Glass Microfibre Filters, Whatman International Ltd Maidstone, England). Nakon toga, 15 mL dobivenog filtrata pročišćeno je na SPE koloni (AflaZon 226+; Romer Labs, Tulln, Austrija). 6 mL eluata podvrgnuto je otparavanju na termobloku (Labnet, AccuBlock, USA) na 50 °C u struji u struji dušika 5.0 (Messer tehnički plinovi, Osijek, Hrvatska), a dobiveni kristalići su rekonstituirani sa 400 µL mobilne faze (A : B = 50: 50). Nakon rekonstitucije uzorak je analiziran na LC-MS/MS uređaju.

Tekući uzorci pripremljeni su na način da je 15 mL uzorka miksano u laboratorijskom mikseru sa 15 mL acetonitrila tijekom 3 min. Nakon toga je uslijedila prethodno navedena procedura. Uzorci koji su sadržavali CO₂ prethodno su podvrgnuti degaziranju tijekom 10 min u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin, Sonorex Super RK 100 H).

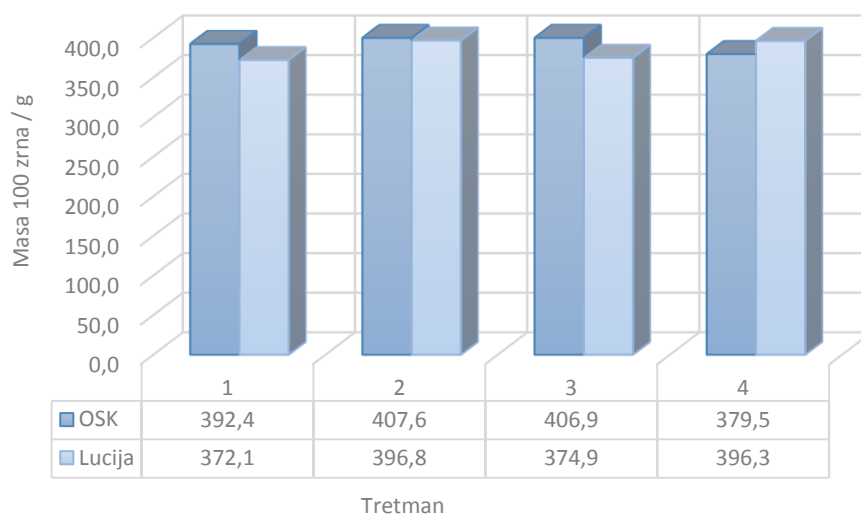
LC-MS/MS sustav se sastojao od Perkin Elmer Series 2000 binarne pumpe s autosamplerom, kolonskom pećnicom (45° C), vakuum rasplinjačem i masenog spektrometra API 2000 Triple-quadrupole MS (Applied Biosystems/MDS SCIEX) opremljenog Analyst version 1.4.2 softverom.

3.2.5. Računske metode i program za obradu rezultata

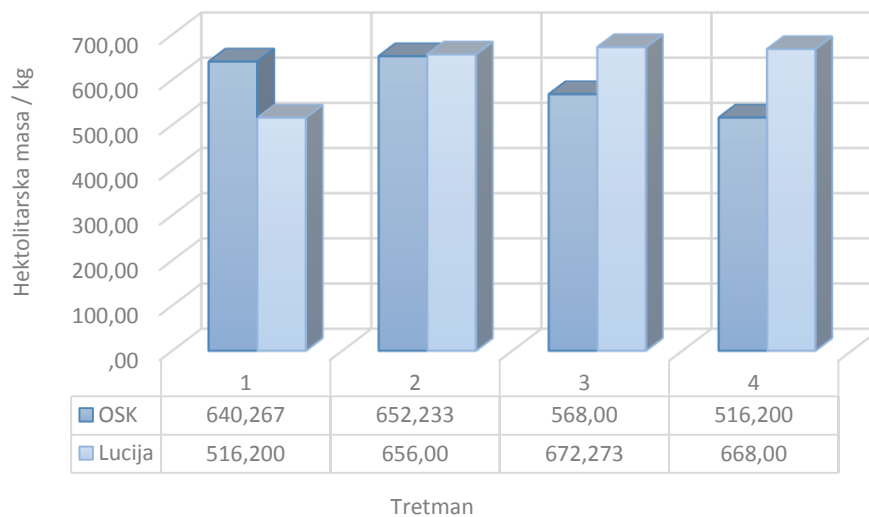
Prilikom statističke obrade rezultata i njihovog prikazivanja u odgovarajućim tablicama i dijagramima korišten je računski program Microsoft Excel 2007.

4. REZULTATI

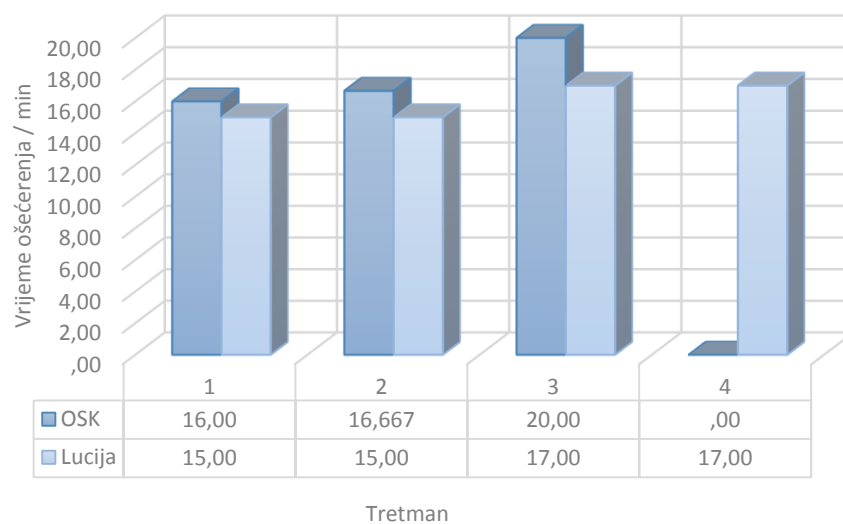
4.1. PRAĆENJE POKAZATELJA KAKVOĆE SLADA



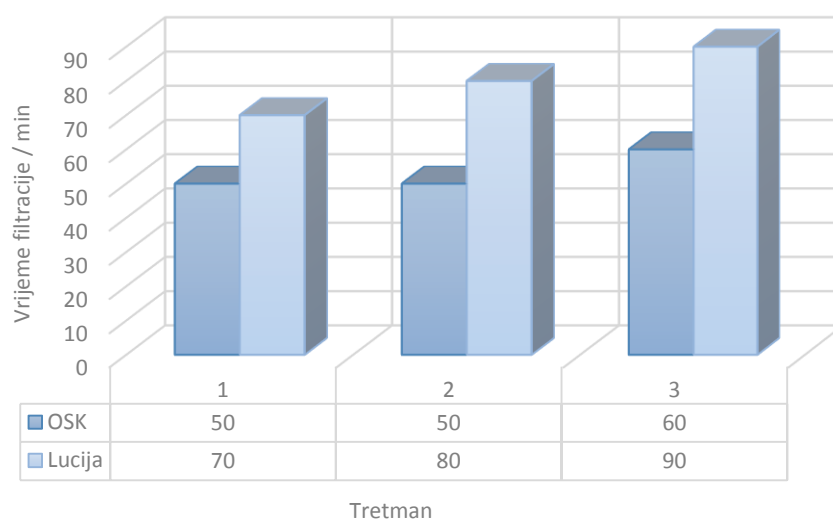
Slika 7 Grafički prikaz ovisnosti mase 1000 zrna o genotipu pšenice i tretmanu



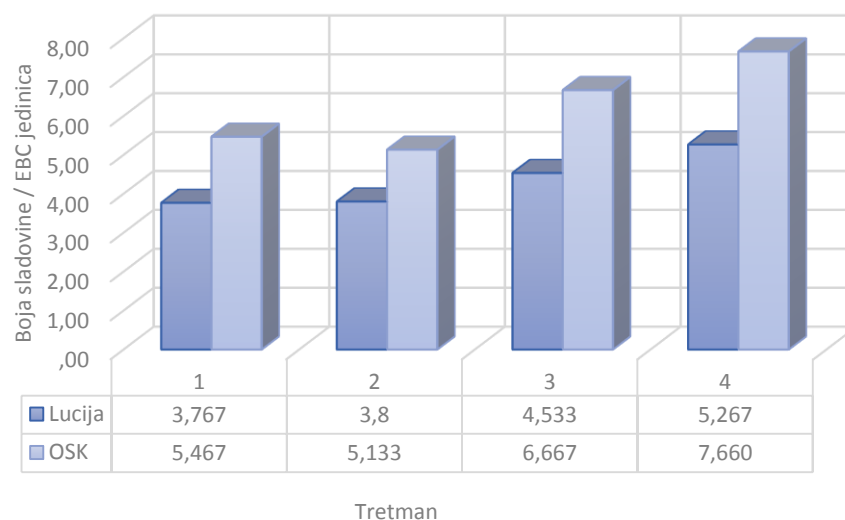
Slika 8 Grafički prikaz ovisnosti hektolitarske mase o genotipu pšenice i tretmanu



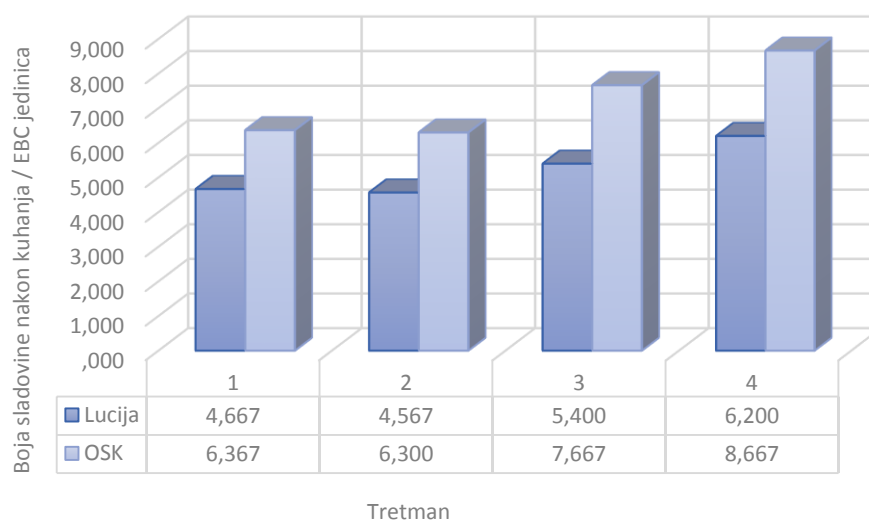
Slika 9 Grafički prikaz ovisnosti vremena ošćerenja o genotipu pšenice i tretmanu



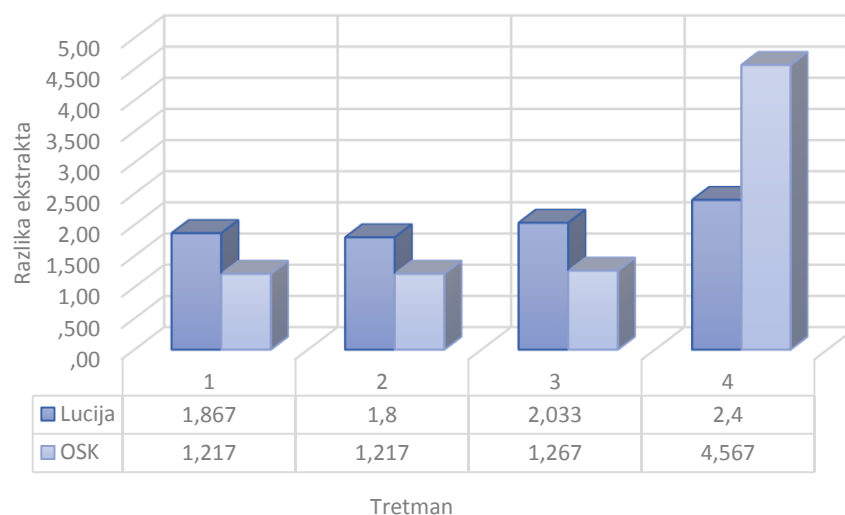
Slika 10 Grafički prikaz ovisnost vremena filtracije o genotipu pšenice i tretmanu



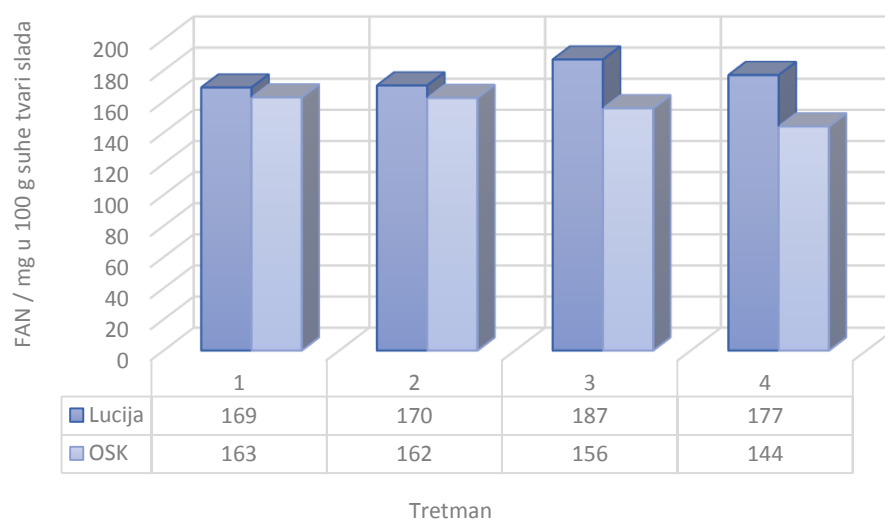
Slika 11 Grafički prikaz ovisnost boje sladovine o genotipu pšenice i tretmanu



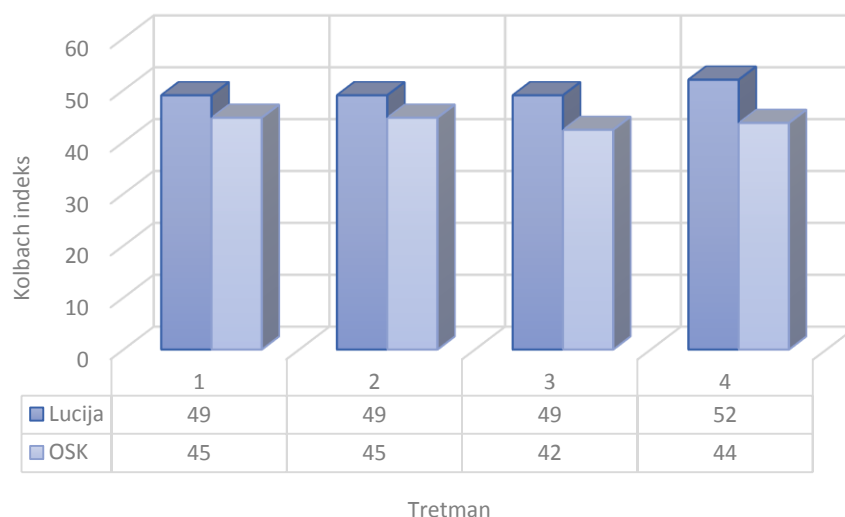
Slika 12 Grafički prikaz ovisnost boje sladovine nakon kuhanja o genotipu i tretmanu



Slika 13 Grafički prikaz ovisnosti vrijednosti razlike ekstrakta o genotipu pšenice i tretmanu

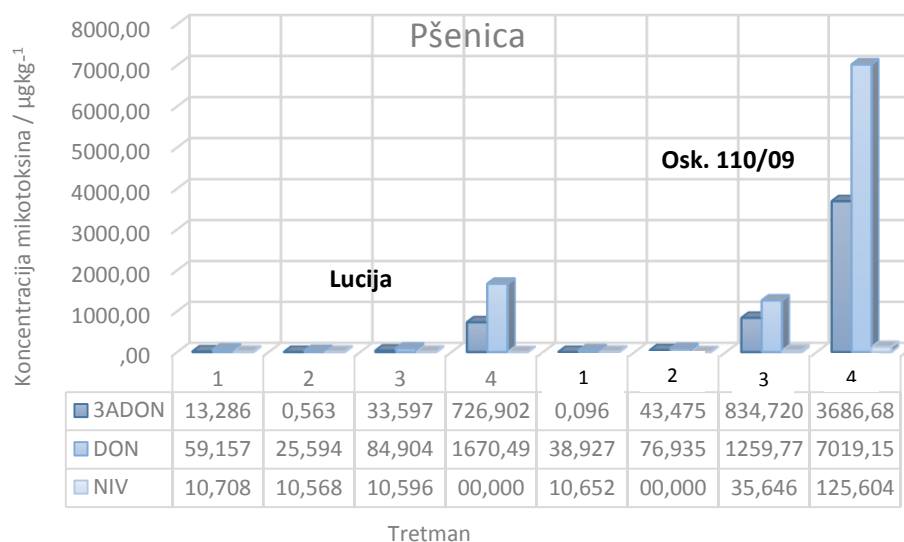


Slika 14 Grafički prikaz ovisnost vrijednosti FAN-a o genotipu pšenice i tretmanu

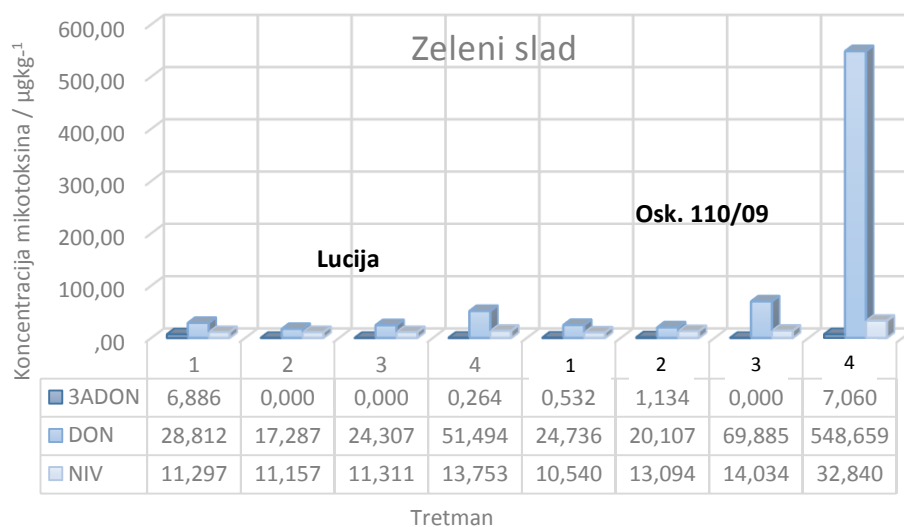


Slika 15 Grafički prikaz ovisnost vrijednosti Kolbach indeksa o genotipu pšenice i tretmanu

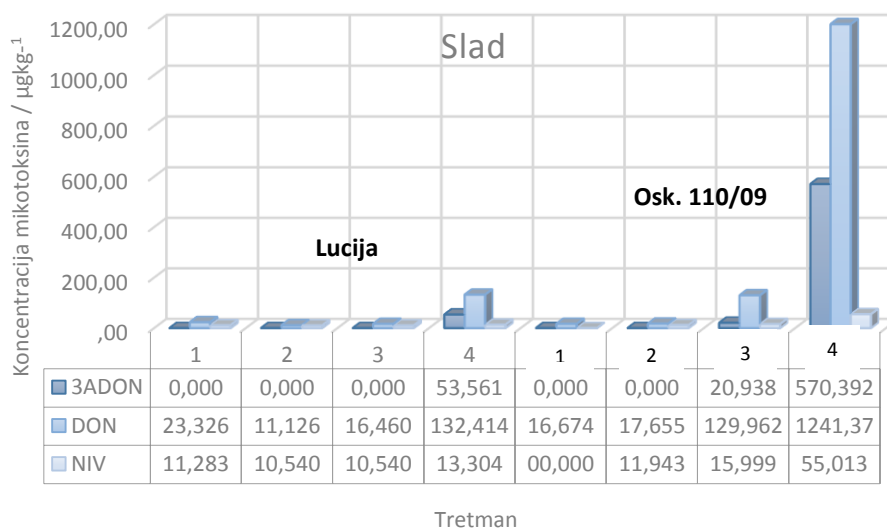
4.2. PRAĆENJE KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA TIJEKOM SLAĐENJA PŠENICE



Slika 16 Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u pšenici u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu



Slika 17 Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u zelenom sladu u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu



Slika 28 Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u gotovom sladu u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu

5. RASPRAVA

5.1. PRAĆENJE POKAZATELJA KAKOVOĆE SLADA

Za potrebe istraživanja na Poljoprivrednom institutu Osijek postavljeni su pokusi u polju na dvagenotipa pšenice kako je opisano u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni uzorci pšenica slađeni su prema modificiranom postupku za slađenje ječma po MEBAK-u (1997), nakon čega su provedene analize odabranih pokazatelja kakvoće dobivenih sladova te određivanje mikotoksina u pšenici, zelenom sladu te gotovom sladu. Dobiveni rezultati analize odabranih pokazatelja kakvoće slada prikazani su grafički na slikama od 7. do 15.

Na **Slici 7** prikazana je ovisnost mase 1000 zrna o sorti i tretmanu na pšenici. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da masa 1000 zrna slada kod genotipa Osk. 110/09 opada s povećanjem stupnja kontaminacije s plijesni *F. culmorum* te je također vidljivo da primjena fungicida značajno utječe na veći prinos pšenice (2 i 3). Kod genotipa Lucija, koji je u startu imao manju masu 1000 zrna, dolazi do povećanja ovih vrijednosti s povećanjem stupnja kontaminacije s plijesni te se ova vrijednost ne povećava primjenom fungicida.

Na **Slici 8** prikazane su vrijednosti za hektolitarsku masu. Od važnih sastojaka u zrnu, škrob ima najveću specifičnu masu, a on je također i sastojak koji daje najveći udio ekstrakta, te se može reći da je pšenica sa najvećom hektolitarskom masom najpogodnija za proizvodnju slada. Vidljivo je da se kod genotipa Osk.110/09 ova vrijednost značajno smanjuje s povećanjem infekcije s plijesni *F. culmorum*. Nadalje, vidljivo je i da primjena fungicida nema značajan utjecaj na povećanje ove vrijednosti ukoliko je došlo do kontaminacije plijesnima roda *Fusarium* (3).

Slika 9 prikazuje ovisnost vremena oštećerenja sladovine o genotipu pšenice i tretmanu. Za obagenotipa pšenice vrijeme oštećerenja je nastupilo u intervalu do 15 min, za uzorke koji nisu bili kontaminirani s plijesni (1, 2). Kod kontaminiranih uzoraka oštećerenje je nastupilo nakon 17 min za Luciju, odnosno nakon 20 min za Osk. 110/09. Za genotip Osk. 110/09 u pokusu 4 nije došlo do oštećerenja. Produženo vrijeme oštećerenja kod uzoraka kontaminiranih s plijesni *F. culmorum* uobičajeno je, budući da zrna kontaminirana ovom plijesni gube sposobnost klijanja jer ne dolazi do biosinteze enzima (Sacher, 1997) te je škrob samo djelomično razgrađen djelovanjem amilolitičkih enzima plijesni (Schwarz i sur., 2002.)

Iz rezultata na **Slici 10** je vidljivo da kontaminacija s plijesni *F. culmorum* negativno utječe na brzinu filtracije sladovine. Kod obagenotipa je došlo do produženja vremena filtracije za

uzorke gdje se pretpostavlja da je stupanj kontaminacije s plijesni veći, pri čemu se uzorci sladovine dobiveni od sladova gdje je pretpostavljena kontaminacija najveća nisu mogli profiltrirati.

Boja sladovine primarni je pokazatelj boje konačnog proizvoda – piva te je stoga potrebno pratiti boju sladovine i sladovine nakon kuhanja tijekom proizvodnog procesa. Vrijednosti boje sladovine (**Slika 11 i 12**) povećavaju se sa stupnjem kontaminacije što je u skladu s istraživanjem koje je proveo Sacher (1997). Obzirom da plijesni roda *Fusarium* proizvode pigmente crvene boje, aurofusarin i rubrofsarin, očekivano je da ovi pigmenti pridonose povećanju vrijednosti boje sladovine i sladovine nakon kuhanja (Sloey i Prentice, 1962). Oliveira i sur. (2012) navode da su za povećanje vrijednosti boje sladovine kontaminiranog slada odgovorne i povećane vrijednosti topljivog dušika te slobodnog amino dušika. Istraživanje koje su proveli Schwarz i sur. (2006) također ukazuje na činjenicu da bi povećane koncentracije mikotoksina DON-a također mogle utjecati na povećane vrijednosti boje sladovine dobivene od kontaminiranog ječma. Vrijednosti boje sladovine veće su za genotip Osk. 110/09.

Povećanje vrijednosti razlike ekstrakta (**Slika 13**) koje se povećava s povećanjem stupnja kontaminacije pšenice s plijesni, u skladu je s istraživanjem koje su proveli Schwarz i sur. (2001). Ovo svojstvo je više izraženo kod genotipa Osk. 110/09, dakle kod genotipakoji je osjetljiviji na infekciju s plijesni *F. culmorum*.

Slobodni α -amino dušik (FAN) (**Slika 14**) u skladu je mjerilo za količinu aminokiselina koje su nastale proteolitičkim zbivanjima tijekom slađenja i u postupku ukomljavanja po kongresnom postupku, a za njega je odgovoran uravnotežen odnos endo- i egzopeptidaza. Prvi od ovih enzima hidrolizom molekula bjelančevina unutar molekule osigurava mnoštvo mjesta za djelovanje drugoga s krajnjim $-\text{COOH}$ ili $-\text{NH}_2$ grupama. Ako dominantnu ulogu imaju endopeptidaze, posljedica je sladovina s povećanim sadržajem frakcija proteina velikih i srednjih molekulskih masa, a količina slobodnih aminokiselina ostaje nedovoljna. Same makro- i srednjemolekularne frakcije kvasac ne može iskoristiti. Nasuprot tome, ako preovladavaju egzopeptidaze (karboksi- ili aminopeptidaze, zavisno od funkcionalne grupe preko koje djeluju), opet se dobiva samo maleni porast FAN-a (nema dovoljno terminalnih grupa, koje su "mjesta napada" ove grupe enzima). Na FAN-a, nadalje, utječe i samo klijanje, jer embrio u anaboličkim procesima troši aminokiseline za izgradnju nove stanične mase lisne

klice i korijenčica, pa se količina slobodnih aminokiselina smanjuje (Schuster, 1988.). Istraživanje koje su proveli Sarlin i sur. (2005) pokazalo je mali porast vrijednosti slobodnog amino dušika u sladovinama dobivenim od sirovine kontaminirane plijesnima roda *Fusarium*. Vrijednosti FAN-a za obje sorte su povećane u uzorcima koji su bili kontaminirani s plijesni, ali se ne primjećuje značajniji učinak primjene fungicida niti utjecaj otpornosti sorte.

Veći sadržaj bjelančevina u zrnu djeluje na porast količine topljivog dušika jer proteini zrna na određeni način predstavljaju supstrat za proteolizu, tj. vrijedi zakonitost po kojoj se koncentracija produkta povećava s porastom koncentracije supstrata. Razgrađenost bjelančevina (odnos ukupnog i topljivog N) ili Kolbachovog indeksa je pokazatelj proteolitičke razgrađenosti slada i ukazuje na aktivnost proteolitičkih enzima. Kod genotipa Lucija Kolbach indeks se povećava samo kod zadnjeg uzorka „4“ koji je inficiran s plijesni *F. culmorum* bez tretmana fungicidom. Kod genotipa Osk. 110/09 vrijednosti Kolbach indexa niže su nego kod genotipa Lucija.

5.2. PRAĆENJE KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA TIJEKOM SLAĐENJA PŠENICE

Slika 16 prikazuje rezultate analize mikotoksina u početnim uzorcima pšenice. Iz rezultata je vidljivo da je plijesan *F. culmorum*, kojom je inficirana pšenica, na polju i tijekom skladištenja prije slađenja, najviše proizvodila mikotoksine DON i 3ADON, a u nešto manjoj mjeri je proizvodila NIV. U uzorcima genotipa Osk. 110/09 koji su umjetno inficirani s plijesni vidljiv je značajan porast koncentracije DON-a te one prelaze dozvoljene vrijednosti za neprerađene žitarice ($1250 \mu\text{g L}^{-1}$) koje propisuje Europska komisija (EC 1881/2006). Povećanu koncentraciju DON-a pokazuje i uzorak genotipa Lucija za koji se očekuje najveći stupanj kontaminacije.

Na **Slici 17** prikazani su rezultati analize mikotoksina u uzorcima zelenog slada. Iako je za očekivati jaču proliferaciju plijesni tijekom slađenja (Sarlin i sur., 2005), u uzorcima zelenog slada došlo je do smanjenja koncentracije mikotoksina u odnosu na početnu koncentraciju u pšenici. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da je plijesan u uzorcima oba genotipa pšenice tijekom slađenja najviše proizvodila mikotoksine DON i NIV, a u nešto manjoj mjeri je proizvodila i 3ADON. Rezultati toksikološke analize zelenog slada pokazali su povećanje koncentracije DON-

a u jače mikrobiološki inficiranim uzorcima (4, Lucija i 8, Osk. 110/09). Povećanje koncentracije DON-a se može objasniti *de novo* sintezom DON-a tijekom kasnijih faza klijanja. Naime, prethodna istraživanja pokazala su da tijekom faze močenja dolazi do smanjenja koncentracije DON-a (Schwarz i sur., 1996.) uslijed njegova otapanja i prelaska dijela u vodu za močenje. Schwartz i sur. (1996.) su utvrdili da tek nakon pet dana klijanja razine DON-a u zelenom sladu postaju puno više od onih u namočenom zrnu (18 – 114 %).

Slika 18 prikazuje rezultate analize mikotoksina u uzorcima gotovog slada. Iz rezultata je vidljivo da je u uzorcima sladova dobivenih od obagenotipa pšenice plijesan proizvodila mikotoksine DON i 3ADON, a u nešto manjoj mjeri NIV. Ovo je posebno vidljivo za genotip Osk. 110/09, odnosno uzorak 4 ovoggenotipa, gdje su vrijednosti za DON visoke, ali ipak ispod dozvoljene granice koju propisuje Europska komisija. Iz mikotoksikološke analize slada može se zaključiti da je sa stajališta zdravstvene ispravnosti genotip Lucija prikladniji za slađenje, odnosno za proizvodnju piva.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Plijesan *F. culmorum* pokazuje negativan utjecaj na ukupnu kakvoću pšeničnog slada, pri čemu je značajniji utjecaj imala na sladove dobivene slađenjem pšenice genotipa Osk. 110/09, koja ima slabiju genetsku otpornost na infekciju plijesnima roda *Fusarium*.

Infekcija uzoraka pšenice s plijesni *F. culmorum* utjecala je na odabrane pokazatelje kakvoće slada na način da je došlo do smanjenja mase 1000 zrna i hekolitarske mase, produljenja vremena oštećenja i vremena filtracije sladovine (ili nemogućnosti filtracije), povećanja vrijednosti boje sladovine, vrijednosti razlike ekstrakta i vrijednosti slobodnog amino dušika.

Soj plijesni *F. culmorum* koji je korišten za umjetnu infekciju oba genotipa pšenice u polju sintetizirao je mikotoksine DON, 3ADON i u nešto manjim količinama NIV. U svim uzorcima 4 (pšenice, zelenog slada, slada) genotipa pšenice Osk. 110/09 koncentracija DON-a je bila iznad propisanih maksimalno dozvoljenih vrijednosti.

Mikotoksikološka analiza uzoraka pšenice, zelenog slada i slada pokazala je značajno veći udio mikotoksina u uzorcima genotipa Osk. 110/09 koji ima slabiju genetsku otpornost na infekciju plijesnima roda *Fusarium*, u odnosu na genotip Lucija.

Budući da dovodi do suzbijanja ili smanjenja infekcije pšenice s plijesni *F. culmorum*, primjena fungicida može imati povoljan utjecaj na ukupnu kakvoću slada (posebice na mikotoksikološku ispravnost). Ipak, u slučaju kada se za slađenje koriste genotipovi slabije genetske otpornosti na infekciju plijesnima roda *Fusarium* taj je učinak značajno manje izražen.

7. LITERATURA

Bai, G., Shaner, G. (2004) Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 135-161.

Beasley, V.R. (1989) Trichotecene mycotoxicosis: photophysiological effects, vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Bennet, J.W., Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497-516.

Bentley, R. i Bennet, J.W. (1999) Constructing polyketides: from Collie to combinatorial synthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 411-446.

Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J. (2012) Masked mycotoxins: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 00, 1-22.

Boyacıoğlu, D., i Hettiarachchi, N.S. (1995) Changes in some biochemical components of wheat grain that was infected with *Fusarium graminearum*. *J. Cer. Sci.* 21, 57-62.

Brennan, J.M., Egan, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M. (2005) Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Patholol.* 54, 156–160.

Briggs, D.E., McGuinness, G. (1993) Microbes on barley grains. *J. Inst. Brew.* 98, 249-255.

Buerstmayr, H., Lemmens, M., Fedak, G., Ruckebauer, P. (1999) Back-cross reciprocal monosomic analysis of *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98, 76-85.

Chandra, G.S., Proudlove, M.O., Bamforth, C.W., Thornton, J.M., Tillett, I.J.L., Palmer, G.H.O. (1997) The effect of morphological structure on the digestibility of barley and wheat endosperms. Home Grown Cereals Authority, Project report 144E.

Christian, M., Titze, J., Ilberg, V., Jacob, F. (2010) New cognitions on gushing in the wort production process and in quantifying the gushing potential of malt. *Cerevisia* 35, 35-37.

Christian, M., Titze, J., Ilberg, V., Jacob, F. (2011) Novel perspectives in gushing analysis: A review. *J. Inst. Brew.* 117, 295-313.

da Rocha, M.E.B., da Chagas Oliveira Freire, F., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D. (2014) Mycotoxins and their effect on human and animal health. *Food Control* 36, 159-165.

Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D. (2005) Species-specific PCR based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 103:271–284.

Desjardings, A.E., Proctor, R.H. (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 47-50.

Doran, P.J., Briggs, D.E. (1993) The use of chemical agents to overcome dormancy in malting barley. *J. Inst. Brew.* 99, 85-89.

Elbert, D., Czapiewski, K., Bujara, I., Kunze, J., Giger, A. (2010) Simultaneous analysis of 10 mycotoxins in crude extracts of different types of grains by LC-MS/MS. ABSCIEX.

Flannigan, B. (1996) Handbook for fourth SAC conference, 45-55.

Gaćeša, S. (1979) Tehnologija slada sa sirovinama za tehnologiju piva. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd

Garda-Buffon, J., Baraj, E., Badiale-Furlong, E. (2010) Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 53, 505-511.

Greenhalgh, R. et al. (1986) Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum*. *J. Agric. Food. Chem.* 34, 98-102.

Habschied, K., Šarkanj, B., Zec Zrinušić, S., Krstanović, V., Suman, K. (2013b) *Fusarium* mycotoxins. International Conference 14th Ružička days "Today science - tomorrow industry" Proceedings / Jukić, Ante (ur.). 200-212.

Habschied, K., Velić, N., Tišma, M., Krstanović, V. (2011b) Utjecaj mikroflore ječma i pšenice na kakvoću slada i piva. *Hrvatski časopis za prehrambeno tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 6, 100-111

Hart, L.P., Pestka, J.J., Liu, M.T. (1984) Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *J. Phytopathol.* 74, 1415-1418.

Hazel, C. M., Patel, S. (2004) Influence of processing on trichotecenes levels. *Toxicol. Lett.* 153, 51-59.

Jurković, D., Culek, M., Ćosić, J. (1998) Mycopopulation of the treated winter wheat seed in eastern Croatia. *Cereal Res. Commun.* 26, 67-72.

Kieninger, H., Harbich, I., Parche, I. (1983) Über die Mikroflora des Malzes. *Brauwelt* 22, 935.

Kłosowski G., Mikulski D., Grajewski J., Błajet-Kosicka A. (2010) The influence of the raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresource Technol.* 101, 3147-3152.

Krstanović, V. (2004) Istraživanje postupaka slađenja domaćih sorti pšenica. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Krstanović, V., Klapac, T., Velić, N., Milaković, Z. (2005) Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the crop years 2001-2003 in Eastern Croatia. *Microbiol. Res.* 160, 353-359.

Lacey, J., Bateman, G.L., Mirocha, C.J. (1999) Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology* 134, 277-283.

Lamper, C., Teren, J., Bartok, T., Komoroczy, R., Mesterhazy, A., Sagi, F. (2000) Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of ergosterol content. *Cereal Res. Commun.* 28, 337-344.

Lauren D.R., Ringrose M.A. (1989) Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *FoodAdd. Contam.* 14, 435-443.

Legzdina L., Buerstmayr, H. (2004) Comparison of infection with *Fusarium* head blight accumulation of mycotoxins in grain of hulles and covered barley. *J. Cereal Sci.* 40, 61-67.

Leskošek-Čukalović, I. (2002) Tehnologija piva I. deo: Slad i nesladovane sirovine. Poljoprivredni fakultet Beograd.

Linko M., Haikara A., Ritala A., Penttilä M. (1998) Recent advances in the malting and brewing industry. *J. Biotechnol.* 65, 85-98.

Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003) Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 645-667.

Lori, G.A., Sisterna, M.N., Haidukowski, M., Rizzo, I. (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiol. Res.* 158, 29-35.

Lowe, P.D., Arendt, E.K. (2004) The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationship to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *J. Inst. Brew.* 110, 163-180

Marić, V., Nadvornik, Z. (1995) Pivo - tekuća hrana. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb.

Mankevičiene A., Butkute B., Gaurilčikiene I., Dabkevičius Z., Supreniene S. (2011) Risk assesment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains, *FoodControl* 22, 970-976.

MEBAK-Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (1997) Brautechnische Analysenmethoden, Bd. I, 3. Izdanje, Weihenstephan, Njemačka.

Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Narodne Novine 154/2008

- Narziss L. (1999) Die Technologie der Malzbereitung, 7 ed., F. Enke, Stuttgart.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasa, W.F.O. (1983) *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.
- Niessen, L., Donhauser, S., Weideneder, A., Geiger, E. (1991) Möglichkeiten einer verbesserten visuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malz. *Brauwelt* 131, 1556-1562.
- Noots, I., Delcour, J.A., Michiels, C.W. (1999) From field barley to malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Critical. Rev. Microbiol.* 25, 121-153.
- Oancea, S., Stoia, M. (2008) Mycotoxins: A review of toxicology, analytical methods and health risks. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology* 1, 19-36.
- Oliviera, P.M., Mauch, A., Jacob, F., Waters, D.M., Arendt, E.K. (2012) Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 32-43.
- Papadopoulou, A., Wheaton, L., Muller, R. (2000) The control of Selected Micro-Organisms During the Malting Process. *J. Inst. Brew.* 106, 179-188.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathol.* 44, 207-238.
- Pronik, C., Cenkowski, S., Abransom, D. (2005) Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. *Food Control* 17, 789-796.
- Rai, M., Varma, A. (2010) Mycotoxins in food, feed and bioweapons. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 253-273.
- Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., Wang, Z. (2007) Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1143, 48-64.

Sacher, B. (1997) Über den Einfluß von Sorte, Umwelt, agronomischen Maßnahmen und Mälzungstechnologie auf die wertbestimmenden Eigenschaften von Winterweizenmalzen. Disertacija, TU München- Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I.

Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A. (2005) Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *J. Inst. Brew.* 111, 105-111.

Schuster, K., Weinfurtner, F., Narziss, L. (1990) Pivarstvo: I deo. Tehnologija proizvodnje slada, prijevod Gaćeša, S., Grujić, O. Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd.

Schwarz, P.B., Beattie, S., Casper H.H. (1996) Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. *J. Inst. Brew.* 102, 93-96

Schwarz, P.B., Casper, H.H., Barr, J., Musial, M. (1997) Impact of *Fusarium* head blight on the malting and brewing quality of barley. *Cer. Res. Commun.* 25, 813-814.

Schwarz, P.B., Jones, B.L., Steffenson, B.J. (2002) Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 130-134.

Schwarz, P.B., Schwarz, J.G., Zhou, A., Prom, L.K., Steffenson, B.J. (2001) Effect of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* infection on barley and malt quality. *Mon. Schr. Brauwiss.* 54, 55-53.

Schwarz, P.B., Horsley, R.D., Steffenson, B.J., Salas, B., Barr, J.M., (2006) Quality risks associated with the utilization of *Fusarium* head blight infected malting barley. *Am. Soc. Brew. Chem.* 64, 1-7.

Scott P.M. (1984) Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Protect.* 47, 489-499.

Scott, P.M. (1989) The natural occurrence of trichotecenes. U V.R. Beardsley (ur.)

W. Sloey, N. Prentice (1962) Effects of *Fusarium* isolates applied during malting on the properties of malt. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 25-29.

Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R. (2010) Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* 3, 94-99.

Sudakin, D.L. (2003) Trichotecenes in the environment: relevance to human health. *Toxico. Lett.* 143, 97-107.

Teich, A.H. (1989) Epidemiology of Wheat Scab Caused by *Fusarium spp.* U Topics in Secondary Metabolism, Taxonomy and Pathogenicity. Chelkowski, J. Ed., Elsevier.

Trucksess, M.W. , Pohland, E.E. (2001) Mycotoxin protocols. Humana. Press Inc, New Jersey.

Tuomi, T., Laakso, S., Rosenqvist, H. (1995) Plant hormones in fungi and bacteria from malting barley. *J. Inst. Brew.* 101, 351-357.

Ueno, Y. (1983) Trichotecenes: chemical, biological and toxicological aspects. Amsterdam: Elsevier.

Van Campenhout, L. (2000): Interactions between barley respiratory activity and its microbial community: towards a controlled germination process. Dizertacija, Katholieke Universiteit Leuven

Váňová, M., Klem, K., Míša, P., Matušinsky, P., Hajšlova, J., Lancová, K. (2008) The content of *Fusarium* mycotoxins, grain yield and quality of winter wheat cultivars under organic and conventional cropping systems. *Plant Soil Environ.* 54, 395-402.

Wagacha, J.M., Muthomi, J.W. (2007) *Fusarium culmorum*: infection process, mechanism of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protect.* 26, 877-885.

Weidenbomer M: Encyclopedia of food mycotoxins. Springer, 2001.

Wolf-Hall, C.E. (2007) Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 89-94.

Wolf-Hall, C.E., Hanna, M.A., Bullerman, L.A. (1999) Stability of deoxynivalenol in heat treated foods. *J. Food Protect.* 62, 962-964.